

明細書

FAM3Dに対する抗体のエフェクター機能による細胞障害方法

5 技術分野

本発明は、FAM3Dに対する抗体のエフェクター機能による細胞障害方法、あるいはそのための組成物に関する。

背景技術

- 10 肺癌は、最もよく見られる致死的なヒトの腫瘍の一つである。非小細胞肺癌 (NSCLC) は、肺腫瘍の80%近くを占め、最もよく見られる形態である (American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2001 (Am. Chem. Soc. Atlanta), 2001)。大半のNSCLCは進行期まで診断されないため、近年の多様式療法 (multi-modality therapy) の進歩にもかかわらず、全体的な10年生存率は10%と低くとど
- 15 まったままである (Fryら, Cancer, 86: 1867-76, 1999)。現在、プラチナを用いた化学療法はNSCLCの治療の基本であると考えられている。しかし薬剤による治療効果は、現在のところ、進行NSCLC患者の生存をある程度延ばすことができる程度に留まっている (Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised
- 20 clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, Bmj, 311: 899-909, 1995)。肺がんに関して、チロシンキナーゼ阻害剤を含む多数の標的療法が研究されている。しかしこれまでに、望ましい治療効果が達成された患者の数は多くない。また一部の患者においては、治療効果とともに重篤な副作用をとまなう場合もあった (Krisら, Proc Am Soc Clin Oncol, 21: 292a (A1166),
- 25 2002)。

- 発癌機構の解明を目的とする研究により、すでに多くの抗腫瘍剤の分子標的候補が見出されている。例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ (FTI) の阻害剤は、動物モデルにおいてRas依存性腫瘍の治療に有効である (Heら, Cell 99:335-45 (1999))。この薬剤は、転写後のファルネシル化に依存するRasに関連する増殖シグナル経路を阻害するために開発された。原癌遺伝子HER2/neuを拮抗する目的のために行われた、抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブと抗癌剤の併用投与は、ヒトでの臨床試験において、臨床反応の改善および乳癌患者の全体的な生存率の改善が達成されている (Linら, Cancer Res 61:6345-9 (2001))。チロシンキナーゼ阻害剤STI-571はbcr-abl融合タンパク質を選択的に不活性化するものである。この薬剤はbcr-ablチロシンキナーゼの恒常的な活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たす慢性骨髄性白血病を治療するために開発された。これらの種類の薬剤は、特異的な遺伝子産物の発癌活性を抑制するようにデザインされている (Fujitaら, Cancer Res 61:7722-6 (2001))。したがって、通常、癌細胞において発現が促進される遺伝子産物は、新規抗癌剤を開発するための潜在的標的となる可能性がある。
- 40

一方、がんの治療戦略の一つとして、がん細胞に結合する抗体が利用されてい

る。抗体によるがん治療の代表的なメカニズムを次に示す。

ミサイル療法：がん細胞に特異的に結合する抗体に薬剤を結合し、薬剤をがん細胞に特異的に作用させる試みである。副作用が強い薬剤であっても、がん細胞に集中的に作用させることができる。薬剤のほか、その前駆体、あるいは前駆体を活性型に代謝する酵素などを抗体に結合する試みも報告されている。

機能性分子を標的とする抗体の利用：たとえば増殖因子やその受容体に結合する抗体によって、がん細胞と増殖因子との結合を阻害する試みである。がん細胞には、増殖因子に依存して増殖するものがある。たとえば、上皮細胞増殖因子(EGF)、あるいは血管内皮細胞(VEGF)依存性のがんが知られている。この種のがんにおいては、増殖因子と細胞の結合を阻害することで治療効果を期待できる。

抗体の細胞障害作用：ある種の抗原に結合する抗体は、がん細胞に対して障害作用を有する場合がある。このような抗体は、抗体分子そのものが、直接的な抗腫瘍効果を有することになる。がんに対して細胞障害作用を示す抗体は、高い抗腫瘍効果を期待できる抗体医薬として注目されている。

発明の開示

本発明者らは、細胞において発現上昇が見られる遺伝子を標的として、細胞の障害作用を誘導することができる抗体を探索した。その結果、FAM3Dを認識する抗体をFAM3D発現細胞に接触させたときに、当該細胞に対する強力な細胞障害作用が誘導されることを明らかにして本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下の医薬組成物、あるいは方法に関する。

〔1〕 FAM3Dに結合する抗体を有効成分として含有する、抗体のエフェクター機能によってFAM3Dを発現する細胞を障害するための医薬組成物。

〔2〕 FAM3Dを発現する細胞が肺がん細胞である〔1〕に記載の医薬組成物。

〔3〕 FAM3Dに結合する抗体が、モノクローナル抗体である〔1〕に記載の医薬組成物。

〔4〕 抗体のエフェクター機能が、抗体依存性細胞障害作用、および補体依存性細胞障害作用のいずれか、または両方である〔1〕に記載の医薬組成物。

〔5〕 次の工程を含む、FAM3Dを発現する細胞を障害するための方法。

1) FAM3Dに結合する抗体を前記FAM3Dを発現する細胞に接触させる工程、および

2) 前記FAM3Dを発現する細胞に結合した前記抗体のエフェクター機能によって前記細胞を障害する工程

〔6〕 FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらを発現することができるDNAを有効成分として含有する、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための免疫原組成物。

〔7〕 FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらを発現することができるDNAまたは細胞を投与する工程を含む、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための方法。

本発明は、FAM3Dに結合する抗体を有効成分として含有する、抗体のエフェクター機能によってFAM3Dを発現する細胞を障害するための医薬組成物に関する。

る。あるいは本発明は、FAM3Dに結合する抗体の、抗体のエフェクター機能によってFAM3Dを発現する細胞を障害するための医薬組成物の製造における使用に関する。本発明における医薬組成物は、FAM3Dに結合する抗体と薬学的に許容される担体を含む。本発明者らは、肺がん患者から採取された肺がん細胞と正常細胞の間でcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を試みた。

そして肺がん細胞において、特異的に発現上昇している複数の遺伝子を同定した。更に、これら肺がん細胞において発現が変化していた遺伝子のうち、主要臓器における発現レベルが低い遺伝子を肺がんの治療標的の候補遺伝子として選択した。主要臓器における発現レベルが低い遺伝子を選択することによって、副作用の危険を避けることができると考えた。こうして選択されたいくつかの遺伝子によってコードされるタンパク質のうち、FAM3Dを認識する抗体がFAM3Dを発現している細胞に対するエフェクター機能を示すことを確認し、本発明を完成した。

本発明者らが得た知見によれば、c-myc-Hisタグを付加したFAM3Dは、強制発現系においては、細胞質顆粒(cytoplasmic granules)、ゴルジ(golgi)、および細胞質膜(cytoplasmic membrane)への局在が観察された。更に培養液中へのFAM3Dの分泌がウエスタンブロッティングによって確認されたことから、FAM3Dは分泌タンパク質であると考えられた。

FAM3D遺伝子は、N末端にシグナルペプチドと予想されるアミノ酸配列をコードしていた。このタンパク質は、先に述べたように、細胞においては、主に細胞質顆粒(cytoplasmic granules)、およびゴルジ(golgi)への局在が観察されたことから、分泌タンパク質である可能性が考えられた。更にこの遺伝子の正常組織における低い発現レベルと、複数の非小細胞がん細胞における高発現は、FAM3Dが診断マーカーや治療標的として有用であることを示唆した。しかし現在のところ、FAM3Dを発現する細胞において、FAM3Dに対する抗体がエフェクター機能を示すことは知られていない。

エフェクター機能でがん細胞を破壊するには、たとえば次のような条件が求められる。

- －がん細胞の膜上に発現している抗原分子数が多いこと
- －抗原の分布ががん組織内で一様であること
- －抗体と結合した抗原が長く細胞表面にとどまっていること

より具体的には、たとえば、抗体が認識する抗原が細胞膜表面に発現している必要がある。加えて、がん組織を構成する細胞における抗原陽性細胞の割合ができるだけ高いことが望まれる。全ての癌細胞が抗原陽性であることが理想的な条件である。がん細胞集団の中で、抗原陽性細胞と陰性細胞が混在する場合には、抗体の臨床的な治療効果は望めない。

また、通常、できるだけたくさんの分子が細胞表面に発現しているほうが、強力なエフェクター機能を期待できる。更に抗原に結合した抗体が細胞内に取り込まれないことが重要である。一部の受容体は、リガンドとの結合の後に細胞内に取り込まれる(endocytosis)場合がある。抗体においても同様に、細胞表面抗原に結合した抗体が細胞内に取り込まれる場合がある。このような現象によって抗体

が細胞内に取り込まれることを、インターナリゼーションと呼んでいる。インターナリゼーションが起きると、抗体のFc領域が細胞内に取り込まれてしまう。一方、エフェクター機能に必要な分子あるいは細胞は、抗原を発現している細胞の外にある。つまり、インターナリゼーションの結果、抗体のエフェクター機能が

5 阻害されることになる。したがって、抗体のエフェクター機能を期待するときには、抗体のインターナリゼーションを起こしにくい抗原を選ぶことが重要である。FAM3Dがこのような特徴を備えた標的抗原であることは、本発明者らによって始めて明らかにされた。

本発明においてエフェクター機能とは、抗体の定常領域(Fc)が関与する細胞障害作用を指す。あるいは、抗原に結合した抗体のFcが、その抗原を有する細胞を障害する作用を駆動する機能を、抗体のエフェクター機能と呼ぶこともできる。より具体的には、抗体依存性細胞障害作用(Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity; ADCC)、補体依存性細胞障害作用(complement dependent Cytotoxicity; CDC)、および中和活性(neutralize activity)が、抗体のエフェク

10 ー機能として知られている。各機能について以下に説明する。

抗体依存性細胞障害作用(Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity; ADCC) :

イムノグロブリンのうち、IgG、IgE、あるいはIgAクラスのイムノグロブリンのFc領域は、それぞれに特異的なFc受容体を持つ細胞が存在する。対応するFc受

20 容体を有する細胞は、細胞膜などに結合した抗体を認識して結合する。たとえば、IgGクラスの抗体は、T細胞、NK細胞、好中球、およびマクロファージ上のFc受容体に認識される。これらの細胞は、IgGクラスの抗体のFc領域に結合して活性化され、抗体が結合した細胞に対する障害作用を発現する。抗体のエフェクター機能を介して細胞障害作用を獲得する細胞群は、エフェクター細胞と呼ばれる。

25 エフェクター細胞の種類に基づいて、ADCCを次のように区別する場合がある。

ADMC : IgG抗体によるマクロファージの活性化機能、および

ADCC : IgG抗体によるNK細胞の活性化機能

本発明におけるADCCのエフェクター細胞の種類は限定されない。すなわち、マクロファージをエフェクター細胞とするADMCは本発明のADCCに含まれる。

特に抗体を用いたがんの治療においては、抗体のADCCが抗腫瘍効果の重要なメカニズムを構成していることが指摘されている(Nature Med., 6: 443-446, 2000)。たとえば抗CD20抗体キメラ抗体の治療効果とADCCとの密接な関係が報告された(Blood, 99: 754-758, 2002)。したがって、本発明においても、抗体のエ

30 フェクター機能の中でADCCは特に重要である。

たとえば既に臨床応用を開始しているハーセプチン (Herceptin) やリツキサン (Rituxan) の抗腫瘍効果の主要なメカニズムの一つはADCCであると考えられている。なお前者は転移性乳がんの、また後者は非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma) の治療薬である。

現在のところ、ADCCによる細胞障害作用メカニズムは、およそ次のように説明されている。すなわち、細胞表面に結合した抗体を介して標的細胞と架橋されたエフェクター細胞が、標的細胞に対して何らかの致死性のシグナルを伝達する

40

ことによって、標的細胞の細胞死が誘導されると考えられている。いずれにせよ、エフェクター細胞による細胞障害作用を誘導する抗体は、本発明におけるエフェクター機能を有する抗体に含まれる。

補体依存性細胞障害作用(compliment dependent Cytotoxicity; CDC) :

- 5 抗原と結合したイムノグロブリンのFc領域は、補体系路を活性化することが知られている。イムノグロブリンのクラスにより、活性化経路が異なる場合があることも明らかにされている。たとえばヒト抗体においては、IgMとIgGが古典経路を活性化する。一方、IgA、IgD、およびIgEは、古典経路を活性化しない。活性化された補体は、いくつかの反応を経て、細胞膜障害活性を有する膜侵襲複合体
- 10 C5b-9(membrane attack complex; MAC)を生成する。こうして生成されたMACは、エフェクター細胞に依存することなく細胞膜やウイルス粒子を障害すると考えられている。MACによる細胞障害は次のようなメカニズムに基づいている。MACは細胞膜に対する強い結合親和性を有する。細胞膜に結合したMACは細胞膜に穴をあける。この穴によって水の出入りが容易となる。その結果、細胞膜の
- 15 不安定化、あるいは浸透圧の変化などがもたらされ、細胞が破壊される。補体の活性化による細胞障害作用は、抗原に結合した抗体の近くにある膜にしか及ばないとされている。そのため、MACによる細胞障害作用は抗体の特異性に依存している。ADCCとCDCは相互に依存することなく細胞障害作用を発現することができる。しかし、生体内においては、実際には、これらの細胞障害作用が、複合的に作用している場合もあると考えられている。
- 20

中和活性(neutralize activity) :

- 抗体の中には、毒素の活性や病原体の感染能力を奪う機能を有する抗体が存在する。抗体による中和は、可変領域の抗原への結合によって達成される場合と、補体の介在を必要とする場合があることが知られている。たとえばウイルスに対
- 25 する抗体には、ウイルスの感染能の喪失のために補体の存在を要求する場合がある。補体が関与するためには、Fc領域が必要である。すなわちこのような抗体は、細胞やウイルスの中和のためにFcを必要とするエフェクター機能を有する抗体である。

- 本発明において、エフェクター機能とは、抗体の抗原認識が引き金となって発現する生物活性を決定する役割、ということもできる。本発明における好ましい標的細胞はがん細胞である。そしてエフェクター細胞は各種抗体のFc領域が担う機能で、抗体クラスに大きく依存している。IgG、IgE、IgAクラスの抗体のFc領域はそれぞれに特異的なFc受容体に結合し、Fc受容体をもつ細胞を活性化したり、抗体の細胞間トランスポートに働く。特にIgGクラス抗体がエフェクター細胞上
- 35 のFc受容体を介して、これらのエフェクター細胞を活性化し、抗体の可変領域が結合した標的細胞を殺すことをADCC（抗体依存性細胞障害）とよぶ。ADCCにおいては、T細胞、NK細胞、好中球、あるいはマクロファージなどがエフェクター細胞として機能する。一方、補体を活性化する機能はIgMとIgGクラスの抗体に限られ、抗体の可変領域が結合した細胞を溶解させる機能を特にCDC（補体依存性細胞障害）と呼ぶ。
- 40

これらのエフェクター機能の中で、本発明において、好ましいエフェクター機

能は、ADCC、およびCDCのいずれか、あるいは両方である。本発明は、FAM3Dを認識する抗体が、FAM3Dを発現する細胞に結合してエフェクター機能を発現することを明らかにしたことに基づいている。

5 また本発明は、次の工程を含むFAM3D細胞を発現する細胞を障害するための方法に関する。

1) FAM3Dに結合する抗体を前記FAM3Dを発現する細胞に接触させる工程、および

2) 前記FAM3Dを発現する細胞に結合した前記抗体のエフェクター機能によって前記細胞を障害する工程

10 本発明の医薬組成物あるいは細胞を障害するための方法において、FAM3Dを発現する細胞は、任意の細胞であることができる。たとえば肺がん細胞は、本発明におけるFAM3Dを発現する細胞として好適である。中でも、非小細胞性肺がん細胞(non-small cell lung cancer; NSCLC) は、本発明におけるFAM3D発現細胞として好ましい。細胞と抗体とは、生体内(*in vivo*)で、あるいは生体外(*in vitro*)において接触させられる。FAM3Dを発現する細胞として生体内にある肺がん細胞を対象とする場合には、本発明の方法は肺がんの治療方法あるいは予防方法に他ならない。すなわち本発明は、次の工程を含む、肺がんの治療方法を提供する。

1) FAM3Dに結合する抗体を肺がん患者に投与する工程、および

20 2) 肺がん細胞に結合した前記抗体のエフェクター機能によって前記細胞を障害する工程

肺がんにおいて過剰発現している遺伝子として本発明者らが同定したFAM3Dは、生命維持に重要な臓器の細胞での発現がほとんどなく、肺がん細胞表面に特異的に発現することを確認している。そしてFAM3Dに対する抗体は、肺がん細胞表面の抗原を特異的に認識し、そのエフェクター機能によりがん細胞障害活性を免疫系細胞に誘導しうると考えられる。

25 FAM3Dに結合する抗体が、そのエフェクター機能によってFAM3Dを発現する細胞、特に肺がん細胞を効果的に障害することを本発明者らは確認している。更に本発明者らは、FAM3Dが高い確率で肺がん細胞で高度に発現していることを確認している。加えて、FAM3Dの正常組織における発現レベルは低い。これらの情報を総合すれば、FAM3Dの投与による肺がんの治療方法は、副作用の危険が小さい、効果的な治療方法であると言えることができる。

30 本発明において、抗体は、目的とするエフェクター機能を有する限り、限定されない。たとえばADCCを発現するためには、IgA、IgE、あるいはIgGのFc領域を有する抗体が必要である。またCDCを発現するためには、抗体のFc領域は、IgMまたはIgGであることが望ましい。したがって、ヒトに由来するこれらのクラスに属する抗体は、本発明における好ましい抗体である。ヒト抗体は、ヒトから採取された抗体産生細胞、あるいはヒトの抗体遺伝子を移植されたキメラ動物(Cloning and Stem Cells., 4: 85-95, 2002)などを利用して得ることができる。

40 また、抗体のFc領域は任意の可変領域に接合することができる。すなわち、

異種の動物の可変領域にヒトの定常領域を接合したキメラ抗体が公知である。あるいはヒト由来の可変領域に、任意の定常領域を接合して、ヒトーヒトキメラ抗体を得ることもできる。更に、ヒト抗体の可変領域を構成するCDRを異種の抗体のCDRで置換する技術(CDR graft)も公知である(“Immunoglobulin genes”, Academic Press(London), pp260-274, 1989; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91: 969-973, 1994)。CDRの置換により、抗体の結合特異性が置換される。すなわち、ヒトのFAM3Dに結合する抗体のCDRを移植されたヒト化抗体は、ヒトのFAM3Dを認識する。移植された抗体は、ヒト化抗体(humanized antibody)とも呼ばれる。このようにして得ることができる、エフェクター機能に必要なFcを備えた抗体は、可変領域の由来に関わらず、本発明における抗体として有用である。たとえば、可変領域として他のクラス、あるいは他の種のイムノグロブリンに由来するアミノ酸配列を含んでいても、ヒトIgGのFcを有する抗体は、本発明における好ましい抗体である。

本発明における抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。ヒトに投与する場合であっても、先に述べたヒトの抗体遺伝子を移植された動物を用いて、ヒトポリクローナル抗体を得ることもできる。あるいはヒト化抗体、ヒトー異種動物キメラ抗体、ヒトーヒトキメラ抗体などの遺伝子工学的手法によって構築されたイムノグロブリンを用いることもできる。更に、ヒト抗体産生細胞をクローン化することによって、ヒトモノクローナル抗体を得る方法も知られている。

本発明の抗体を得るためには、FAM3Dまたはその部分ペプチドからなる断片が免疫原として利用される。本発明におけるFAM3Dの由来は、任意の種であることができる。好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳類に由来し、より好ましくはヒトに由来する。ヒトFAM3Dの塩基配列、並びにアミノ酸配列は公知である(NM_138805)。FAM3DのcDNAの塩基配列を配列番号：1に、その塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：2に示した。与えられた塩基配列を有する遺伝子を単離し、必要に応じてその断片を調製し、目的とするアミノ酸配列を有するタンパク質を得ることは当業者が日常的に行っていることである。

たとえばFAM3Dタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を、公知の発現ベクターに挿入した後に、宿主細胞を形質転換するために使用することができる。所望のタンパク質、またはその断片は、宿主細胞の内外から任意の標準的な方法により回収することができ、またその後、抗原として使用することができる。または、タンパク質もしくはその溶解物、または化学的に合成されたタンパク質を、抗原として使用することができる。更に、FAM3Dタンパク質またはその断片を発現する細胞そのものを免疫原として利用することもできる。

FAM3Dの免疫原として部分ペプチドを用いる場合には、特に細胞外ドメインと予測される領域を構成するアミノ酸配列を選択するのが望ましい。

FAM3DのN末端1-16にシグナルペプチドの存在が予測される。したがって、たとえばN末端側のシグナルペプチド(16アミノ酸残基)を除く領域は、本

発明における抗体を得るための免疫原として好ましい。すなわち、FAM3Dの細胞外ドメインに結合する抗体は、本発明における抗体として好ましい。

したがって、FAM3Dの細胞外ドメインに結合することができる可変領域と、エフェクター機能に必要なFcを備えた抗体が、本発明における好ましい抗体である。ヒトに投与することを目的とする場合には、IgGのFcを備えることが望ましい。

任意の哺乳動物をこの抗原で免疫化することができるが、好ましくは、細胞融合に用いる親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯類、ウサギ目、または霊長類の動物を使用する。

げっ歯類の動物には、例えばマウス、ラット、およびハムスターなどが含まれる。ウサギ目の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長類の動物には、例えばカニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル、マントヒヒ (*sacred baboon*)、およびチンパンジーなどの狭鼻猿類のサル (旧世界ザル) が含まれる。

動物を抗原で免疫化する方法は当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳類を免疫化する標準的な方法である。具体的には、抗原は適量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) や生理食塩水などで希釈および懸濁することができる。所望ならば、抗原懸濁物を、フロイント完全アジュバントなどの適量の標準的なアジュバントと混合し、乳濁液にした後、哺乳動物に投与することができる。好ましくは、これに続いて、適量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を、4~21日毎に複数回投与する。適切な担体を免疫化に使用することもできる。上記のように免疫化を行った後に、所望の抗体量の増加に関して、標準的な方法で血清を調べる。

FAM3Dのタンパク質に対するポリクローナル抗体は、血清中の所望の抗体の増加を調べた免疫化した哺乳類から血液を回収することにより、および任意の従来の方法で血清を血液から分離することにより、調製することができる。ポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体を含む血清、ならびに血清から単離可能なポリクローナル抗体を含む画分を含む。IgGまたはIgMは、FAM3Dタンパク質を認識する画分から、例えばFAM3Dタンパク質を結合させたアフィニティカラムを用いて、この画分をプロテインAまたはプロテインGのカラムでさらに精製することにより、調製することができる。本発明において、ポリクローナル抗体は、抗血清のまま用いることもできる。あるいは、精製されたIgGやIgMを用いることもできる。

モノクローナル抗体を調製するため、抗原で免疫化した哺乳類から免疫細胞を回収し、上述のように血清中の所望の抗体レベルの増加を調べ、細胞融合に使用する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記の免疫細胞と融合される他の好ましい親細胞には、例えば哺乳類のミエローマ細胞、およびより好ましくは、薬剤によって融合細胞を選択するための性質を獲得したミエローマ細胞などが含まれる。

上記の免疫細胞およびミエローマ細胞は、公知の方法、例えばMilsteinらの方法に従って融合することができる (Galfre, G.およびMilstein, C., Methods.

Enzymol. (1981)、73、3-46)。

細胞融合によって得られるハイブリドーマを、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地で培養することにより、選択することができる。細胞培養は通常、HAT培地中で数
5 日から数週間、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（融合していない細胞）を死滅させるのに十分な期間、継続する。次に、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングおよびクローニングを行う。

ハイブリドーマを調製するための抗原で非ヒト動物を免疫化する上記の方法
10 に加えて、EBウイルスに感染させた細胞などのヒトリンパ球を、タンパク質、タンパク質発現細胞、またはこれらの溶解物を用いてインビトロで免疫化することができる。次に、免疫化されたリンパ球を、無制限に分裂可能なヒト由来のミエローマ細胞（U266など）と融合させることにより、タンパク質に結合可能な所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマが得られる（特開昭63-
15 17688号）。

得られたハイブリドーマを、続いてマウスの腹腔に移植して腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のタンパク質を結合させたアフィニティカラムによって精製すること
20 ができる。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製および検出だけでなく、本発明のタンパク質の作用物質および拮抗物質の候補として使用することもできる。また、この抗体を、本発明のタンパク質に関連する疾患の抗体療法に応用することができる。得られた抗体をヒトの身体に投与する場合（抗体療法）は、ヒト抗体またはヒト化抗体は免疫原性を低下させるために好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を、タンパク質、タンパク質発現細胞、またはこれらの溶解物から選択される抗原で免疫化することができる。次に抗体産生細胞を動物から回収し、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを得て、このハイブリドーマからタンパク質
25 に対するヒト抗体を調製することができる（国際公開公報第92-03918号、国際公開公報第93-2227号、国際公開公報第94-02602号、国際公開公報第94-25585号、国際公開公報第96-33735号、および国際公開公報第96-34096号を参照）。

または、抗体を産生する免疫化されたリンパ球などの免疫細胞を、癌遺伝子によって不死化して、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。

35 このようにして得られたモノクローナル抗体は、遺伝子工学的手法を用いて調製することもできる（例えば、Borrebæck, C.A.K.およびLarrick, J.W., Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers社（英国、1990）を参照）。例えば抗体をコードするDNAを、ハイブリドーマまたは抗体を産生する免疫化されたリンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入し、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。
40 本発明には、上述のように調製された組換え抗体を利用することもできる。

抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）などの様々な分子との結合によって修飾することができる。このような修飾抗体を本発明に利用することもできる。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することにより得られる。このような修飾法は当技術分野で常套的なものである。抗体を他のタンパク質分子によって修飾することもできる。タンパク質分子で修飾された抗体は、遺伝子工学的に作成することができる。すなわち、抗体遺伝子と修飾タンパク質分子をコードする遺伝子の融合により、目的とするタンパク質を発現させることができる。たとえば、サイトカインあるいはケモカインとの結合によって、抗体のエフェクター機能の強化が期待される。実際、IL-2やGM-CSFとの融合タンパク質において、抗体のエフェクター機能の強化が確認されている(Human Antibody, 10: 43-49, 2000)。エフェクター機能を強化するサイトカインあるいはケモカインとして、IL-2、IL-12、GM-CSF、TNF、あるいは好酸球走化性物質(RANTES)などを示すことができる。

または本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とのキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域（CDR）、ヒト抗体由来のフレームワーク領域（FR）、および定常領域を含むヒト化抗体として得られる。このような抗体は、公知の手法で調製することができる。

上述のように得られた抗体を均一になるまで精製することができる。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に関して用いられる分離法および精製法に従って実施することができる。例えば抗体は、アフィニティクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動などを含むがこれらに限定されないカラムクロマトグラフィーを、適切に選択し組み合わせることによって、分離および単離することができる（「Antibodies : A Laboratory Manual」、HarlowおよびDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory、1988）。

プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROS、およびSepharose F.F. (Pharmacia) が含まれる。

例示的なクロマトグラフィー（アフィニティクロマトグラフィーを除く）には、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどがある

（「Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual」、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1996）。クロマトグラフィーの手順は、HPLCやFPLCなどの液相クロマトグラフィーにより実施することができる。

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA）、酵素免疫アッセイ法（EIA）、放射免疫アッセイ法（RIA）、および/または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAでは、本発明の抗体をプレート上に固定し、本発明のタンパク質をプレート上に添加した後に、抗体産生細胞の培養上清または精製抗体などの所望の抗体を含む試料を添加する。次に、一次抗体を認識しアルカリホスファターゼなどの酵素で

標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。タンパク質の断片（C末端またはN末端の断片など）もタンパク質と同様に使用することができる。BIAcore
5 (Pharmacia) を用いて、本発明に係る抗体の結合活性を評価することができる。

更に、たとえば実施例に示すような方法にしたがって、抗体のエフェクター機能を評価することもできる。たとえば、エフェクター機能を評価すべき抗体の存在下で、FAM3Dを発現する標的細胞とエフェクター細胞とをインキュベ
10 ートする。標的細胞の破壊が検出されれば、その抗体はADCCを誘導するエフェクター機能を有していることが確認できる。エフェクター機能のレベルは、抗体またはエフェクター細胞のいずれかが無い条件下で観察される標的細胞の破壊のレベルを対照として比較することができる。標的細胞には、FAM3Dを発現していることが明らかな細胞を利用することができる。具体的には、実施
15 例においてFAM3Dの発現が確認された各種の細胞株を用いることができる。これらの細胞株は、セルバンクから入手することができる。そして、より強力なエフェクター機能を有するモノクローナル抗体が選択される。

本発明においては、ヒトあるいは他の動物にFAM3Dに対する抗体を薬剤として投与する。本発明において、抗体を投与するヒト以外の動物としては、マ
20 ウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、チンパンジーなどを示すことができる。抗体は、対象に対して直接投与することができるほか、公知の薬学的調製法を用いて投与剤型に製剤化することができる。例えば必要に応じて、水または他の任意の薬学的に許容される液体との無菌性溶液もしくは懸濁液の注射液の形状で非経口的に投
25 与することができる。例えば、このような化合物は、薬学的に許容される担体または溶媒、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤などと共に、一般に容認された薬剤使用に必要な単位用量中に混合することができる。

生理食塩水、グルコース、およびアジュバント（D-ソルビトール、D-マン
30 ノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムなど）を含む他の等張性溶液を、注射用水溶液として使用することができる。これらは、アルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール（例えばプロピレングリコールやポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80（商標）やHCO-50）などの適切な可溶化剤とともに使用することができる。

35 ゴマ油またはダイズ油を油性溶液として使用することができ、可溶化剤として安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールとともに使用することができ、また緩衝液（リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液など）；鎮痛薬（塩酸プロカインなど）；安定剤（ベンジルアルコール、フェノールなど）；ならびに抗酸化剤を用いて製剤化することができる。調製した注射液は適切なアン
40 プルに充填することができる。

本発明において、FAM3Dに対する抗体は、例えば動脈内注射、静脈内注射、

5 経皮内注射として、また鼻腔内投与、経気管支投与、局所投与、あるいは筋肉内投与などの方法で患者に投与することができる。たとえば肺がん患者に抗体を全身投与する方法としては、点滴あるいは注射による血管内投与（静脈）が一般的である。抗体薬を肺がん原発巣もしくは肺内転移巣局所に集積させる方法としては気管支鏡(bronchoscopy)を用いた局所注入、CTガイド下の局所注
10 入、もしくは胸腔鏡下の局所注入（Injection under CT guidance or with thoracoscopy）等を利用することもできる。更に、動脈内カテーテルをがん細胞に栄養を供給する動脈付近まで挿入し、抗体薬等の抗がん剤を局所注入する方法は、肺がん原発巣のみならず転移巣の局所コントロール治療にも有効である。

15 用量および投与方法は、患者の体重および年齢ならびに投与方法に応じて変化するが、当業者であればこれらを慣例的に選択することができる。更に抗体をコードするDNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、ベクターを治療のために投与することができる。用量および投与方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、当業者であればこれらを適切に選択することができる。

20 FAM3D抗体は、生体において、FAM3D発現細胞に対するエフェクター機能に基づく細胞障害作用が確認できる量が投与される。例えば、症状によってある程度の差があるものの、FAM3D抗体の用量は、1日当たり、0.1 ~ 250 mg/kgである。通常、成人（体重60kg）1人当たりの投与量は、5 mg~17.5 g/day、好ましくは5 mg~10 g/day、より好ましくは100 mg~3 g/dayである。投与スケジュールとしては、2日~10日間隔で、1~10回、たとえば3~6回の投与を試みて経過が観察される。

25 加えて本発明は、FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらを発現することができるDNAまたは細胞を有効成分として含有する、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための免疫原組成物を提供する。あるいは本発明は、FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらを発現することができるDNAまたは細胞の、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための免疫原組成物の製造における使用に関する。

30 FAM3D抗体の投与は、そのエフェクター機能によってがん細胞を障害する。したがって、FAM3D抗体を生体内に誘導することができれば、抗体の投与と同等の治療効果を達成することができる。抗原を含む免疫原組成物を投与すれば、生体内において、目的とする抗体を誘導することができる。本発明の免疫原組成物は、FAM3Dを発現する細胞に対するワクチン療法を可能とする。したがって、
35 本発明の免疫原組成物は、たとえば肺がんの治療のためのワクチン組成物として有用である。

40 本発明の免疫原組成物は、FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片を有効成分として含有することができる。FAM3Dの免疫学的に活性な断片とは、FAM3Dを認識し、かつエフェクター機能を有する抗体を誘導する断片を言う。以下FAM3Dおよびその免疫学的に活性な断片を、免疫原タンパク質と記載する。あ

る断片が目的とする抗体を誘導するかどうかは、実際に動物に免疫し、誘導される抗体の活性を確認することによって知ることができる。抗体の誘導と、その活性の確認は、たとえば実施例に記載したような方法によって実施することができる。たとえば、FAM3Dの28-172位あるいは69-208位に相当するアミノ酸配列からなる断片は、本発明における免疫原として有用である。

本発明の免疫原組成物は、有効成分である免疫原タンパク質に加えて、薬学的に許容される担体を含む。更に必要に応じて、アジュバントを組み合わせることができる。アジュバントとしては、結核死菌、ジフテリアトキソイド、あるいはサポニンなどを利用することができる。

あるいは、免疫原タンパク質をコードするDNA、もしくは当該DNAを発現可能に保持した細胞を、免疫原組成物として利用することもできる。目的とする抗原を発現するDNAを免疫原として用いる、いわゆるDNAワクチンの手法は公知である。DNAワクチンは、FAM3Dまたはその断片をコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込むことにより、得ることができる。

ベクターには、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、並びにセンダイウイルスベクターなどを利用することができる。更に、免疫原タンパク質をコードするDNAをプロモーターの下流に機能的に連結したDNAをネーキッドDNAとして直接細胞に導入し、発現させることも可能である。ネーキッドDNAは、リポソームやウイルスエンベロープベクターなどに封入して細胞に導入することができる。

更に、免疫原タンパク質を発現することができるベクターあるいはDNAを導入した免疫原タンパク質発現細胞を、本発明における免疫原組成物として利用することもできる。たとえば患者の血液細胞を回収し、免疫原タンパク質を発現することができるベクターで形質転換し、患者に戻すことができる。形質転換された血液細胞は、患者の体内において免疫原タンパク質を産生し、目的とする抗体を誘導する。

免疫原タンパク質をコードするDNA、あるいはそれによって形質転換された細胞を、本発明の免疫原組成物として利用する場合には、免疫原タンパク質とともに、その免疫原性を強化するキャリアータンパク質を併用することができる。

あるいは本発明は、FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらを発現することができるDNAまたは細胞を投与する工程を含む、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための方法を提供する。本発明の方法によって、肺がんなどのFAM3D発現細胞を障害するエフェクター機能を有する抗体が誘導される。その結果、肺がんなどの治療効果を得ることができる。

本発明における免疫原組成物は、経口、あるいは非経口的に、たとえば0.1～250 mg/kg/day 投与することができる。非経口的な投与には、たとえば皮下注射、あるいは静脈注射などが含まれる。成人1人あたりの投与量は、通常、5 mg ～ 17.5 g/day、好ましくは5 mg～10 g/day、より好ましくは100 mg～3 g/dayである。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書

に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図1は、抗FAM3D抗体を用いたADCCアッセイの結果を示す図である。図中、
5 縦軸は細胞障害活性(%)、横軸はエフェクター細胞：標的細胞比(E:T比)を示す。
細胞障害活性は、 $\% \text{ specific lysis (特異的溶解)} = 100 \times (\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm})$ により求めた。

experimental cpm：(実験的cpm) 各条件において測定された上清の計数値

spontaneous cpm：(自発的cpm) バックグラウンドの計数値

10 maximum cpm：(最大計数値) 標識された標的細胞の計数値

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明する。

[細胞株]

15 ヒト肺癌細胞株は、10%ウシ胎仔血清を添加した適切な培地中で、単層として増殖させた。実験に用いた細胞株を表1に示した。

表1

細胞株	培地	入手先
肺腺癌 (ADC)		
PC-14	RPMI-1640(10%FBS)	Tokyo Medical College
LC319	RPMI-1640(10%FBS)	Aichi Cancer Center
NCI-H1373	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC (CRL-5866)
肺扁平上皮癌 (SCC)		
RERF-LC-AI	DMEM(10%FBS)	RERF
EBC-1	DMEM (10%FBS)	Okayama University
NCI-H2170	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC (CRL-5928)
NCI-H226	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC (CRL-5826)
小細胞肺癌 (SCLC)		
DMS114	RPMI-1640(10%FBS)	ATCC (CRL-2066)
SBC-3	DMEM(10%FBS)	Okayama University
SBC-5	EMEM(10%FBS)	Okayama University

更に、抗FAM3D抗体によるADCCアッセイに以下の細胞株を用いた。：

20 肺腺癌 (ADC) ; LC319、PC-14、NCI-H1373

肺扁平上皮癌 (SCC) ; RERF-LC-AI、EBC-1、NCI-H2170、NCL-H226

小細胞肺癌 (SCLC) ; DMS114、SBC-3、SBC-5。

[抗体の作製]

25 個々のタンパク質特異的抗体は、標準の手順に従い、細菌内で発現させたHisタグ融合タンパク質を免疫原として産生させた。融合タンパク質にはタンパク質の一部(28~172残基および69~208残基)に相当するタンパク質の部分を組み入れた。

[フローサイトメトリー解析]

癌細胞 (1 x 10⁶個) を精製ポリクローナル抗体 (pAb) またはウサギIgG (対

- 15 / 18 -

照)とともに、4℃で1時間インキュベートした。細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄した後、FITC標識Alexa Flour 488中で4℃で30分間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、フローサイトメーター(FACScan、Becton Dickinson)で分析してModFitソフトウェア(Verity Software House, Inc.)により解析した。平均蛍光強度(MFI)は、フローサイトメーター強度の比率(各タンパク質特異的抗体による強度/ウサギIgGによる強度)として定義した。

抗FAM3D抗体BB016を用いて、LC319、PC-14、NCI-H1373、RERF-LC-AI、EBC-1、NCI-H2170、NCL-H226、DMS114、SBC-3、およびSBC-5細胞上のFAM3D発現を検査した。その結果、抗FAM3D抗体(BB016)は、ウサギIgG(対照)が結合するよりも高い比率で全細胞に結合した(表2)。

表2

細胞株	由来	FAM3D発現(MFI ^a)
LC319	ADC ^b	14.5
PC-14	ADC	5.7
NCI-H1373	ADC	5.0
RERF-LC-AI	SCC ^b	5.6
EBC-1	SCC	2.9
HCI-H2170	SCC	19.6
HCI-H226	SCC	4
DMS114	SCLC ^d	5.9
SBC-3	SCLC	6.3
SBC-5	SCLC	29.9

a 平均蛍光強度

b 肺腺癌

c 肺扁平上皮癌

d 小細胞肺癌

〔ADCCアッセイ法〕

標的細胞を⁵¹Cr 100μCiとともに37℃で1時間標識した後、これらの細胞を10分ごとに混合して懸濁状態を保った。アッセイ用に添加する前に標的癌細胞を2回洗浄し、その後96ウェルU底プレートに播種した(2 x 10⁴細胞/ウェル)。ヒト末梢血単核細胞(PMBC)を健常人から採取し、Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) 密度勾配遠心分離により分離し、エフェクター細胞として使用した。様々なE:T比(50:1、25:1、12.5:1、および6.25:1)の標的癌細胞(T)およびエフェクター細胞(E)を、抗FAM3D抗体BB016(2μg/ウェル)または対照抗体ハーセプチン(2μg/ウェル; Roche)とともに、96ウェルU底プレートでAIM-V培地(Life Technologies, Inc.) 200μl中、3連で、37℃にて6時間インキュベートした。SBC-5細胞に対する抗FAM3D抗体(BB016)のADCC効果は、上清(70μl)の放射能をガンマカウンターで測定した場合の測定値に基づいて評価した。式: % 特異的溶解 = 100 x (実験的cpm - 自発的cpm) / (最大cpm - 自発的cpm) に従い、特異的溶解の割合を算出した。抗FAM3D抗体BB016のみまたはエフェクター細胞のみと標的細胞をインキュベーションして対照アッセイとした。ハーセ

プチンは、いくつかの実験において対照として用いた。抗FAM3D抗体BB016自体によるSBC-5細胞に対する直接的な細胞障害は認められなかったが、BB016はFAM3Dを過剰発現するSBC-5細胞に対してADCCを誘導した（図1）。

5 産業上の利用の可能性

本発明によって、FAM3Dを発現する細胞を抗体の細胞障害作用によって障害できることが明らかにされた。FAM3Dは肺がんで高発現している遺伝子として本発明者らが同定した遺伝子である。したがって、FAM3Dに結合する抗体によって、肺がんの治療が可能である。実際本発明者らが確認した結果によれば、肺癌細胞株において、FAM3D抗体存在下でのADCC効果による細胞障害が確認された。

10

- 17 / 18 -

請求の範囲

1. FAM3Dに結合する抗体を有効成分として含有する、抗体のエフェクター機能によってFAM3Dを発現する細胞を障害するための医薬組成物。
- 5 2. FAM3Dを発現する細胞が肺がん細胞である請求項1に記載の医薬組成物。
3. FAM3Dに結合する抗体が、モノクローナル抗体である請求項1に記載の医薬組成物。
4. 抗体のエフェクター機能が、抗体依存性細胞障害作用、および補体依存性細胞障害作用のいずれか、または両方である請求項1に記載の医薬組成物。
- 10 5. 次の工程を含む、FAM3Dを発現する細胞を障害する方法。
 - 1) FAM3Dに結合する抗体を前記FAM3Dを発現する細胞に接触させる工程、および
 - 2) 前記FAM3Dを発現する細胞に結合した前記抗体のエフェクター機能によって前記細胞を障害する工程
- 15 6. FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらが発現することができるDNAを有効成分として含有する、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導するための免疫原組成物。
7. FAM3Dまたはその免疫学的に活性な断片、もしくはそれらが発現することができるDNAまたは細胞を投与する工程を含む、FAM3Dを発現する細胞に対するエフェクター機能を有する抗体を誘導する方法。
- 20

- 18 / 18 -

要約書

- 5 本発明は、FAM3Dを認識する抗体のエフェクター機能に基づく細胞障害作用の利用に関する。すなわち本発明は、FAM3Dを認識する抗体を有効成分として含有する、FAM3D発現細胞を抗体のエフェクター機能によって障害するための医薬組成物、あるいは方法を提供する。FAM3Dは肺がん細胞において高発現しているので、本発明は肺がんの治療に有用である。